

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/03/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E  
RETICULOCITOMETRIA EM CÃES ACOMETIDOS POR  
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Amanda Bizare  
Médica Veterinária**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E  
RETICULOCITOMETRIA EMCÃES ACOMETIDOS POR  
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Amanda Bizare**

**Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana – Orientador**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marileda Bonafim Carvalho - Coorientadora**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica.

**2020**

Bizare, Amanda

B625f      Fragilidade osmótica eritrocitária e reticulocitometria de cães  
              acometidos por doença renal crônica. / Amanda Bizare. -- Jaboticabal,  
              2020

41 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Coorientadora: Marileda Bonafim Carvalho

1. Citofluorometria. 2. Hemácias. 3. Hemólise. 4. Nefropatia crônica.  
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca  
da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados  
fornecidos pela autora.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**AMANDA BIZARE** – nasceu em Colina, interior do Estado de São Paulo, no dia dois de maio de 1992. Filha de Ulisses Ricardo Bizare e Maria Valéria Paro Bizare. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2015, pela Universidade Federal de Uberlândia –UFU, Uberlândia-MG. Durante a graduação integrou o Programa de Educação Tutorial (PET) de 2013 a 2015 e foi monitora nas disciplinas de genética e anatomia veterinária durante o ano de 2013. Participou do Programa de Residência em Medicina Veterinária do MEC junto ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFU, de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2018. Ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Clínica Médica Veterinária da FCAV-Unesp em março de 2018 sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e coorientação da Prof. Dra. Marileda Bonafim Carvalho. Durante o mestrado foi integrante do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária – GPNUV coordenado pela Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho e do Grupo de Pesquisa em Citologia Veterinária – GECITO coordenado pelo Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, período em que participou ativamente da rotina de análises clínico-patológicas desenvolvidas junto ao Laboratório de Patologia Clínica do HV/ FCAV/ UNESP, rotina consagrada, sobretudo, ao ensino, pesquisa e extensão.

*Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida. Basta que lute e aguarde um novo amanhecer – Margaret Thatcher*

À minha família e ao meu noivo, com todo meu amor e gratidão, por serem minha base, meu porto seguro, por sempre torcerem e me apoiarem nas minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto aqui minha sincera gratidão:

Primeiramente a Deus por me amparar e guiar meus passos, me dar paciência e discernimento para concretizar mais esta etapa de minha vida;

Ao meus pais, Ulisses e Maria Valéria, e ao meu irmão João pelo amor incondicional em todos os momentos. Agradeço pela paciência, dedicação, compreensão e apoio em todas as minhas escolhas profissionais, obrigada por estarem sempre por perto mesmo quando a distância física era grande.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, por ter me recebido como a sua orientada, por toda a confiança depositada, por me apoiar e motivar em todas as fases desta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marileda Bonafim Carvalho, professora responsável pelo Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal, por ter aberto as portas do seu setor e por ter me ensinado tanto, desde clínica, estatística e até mesmo sobre a vida.

Ao meu noivo, Mateus Junqueira Napolitano Nogueira, pelo apoio, companheirismo, paciência e compressão, sempre entendendo tão carinhosamente minha ausência em alguns momentos e angústias.

A todos aqueles que integram o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal-SP, inclusive pós-graduandos, técnicos, residentes e estagiários pelo auxílio nas análises, correções, motivação diária, companheirismo e amizade.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta caminhada, alguns de longa data e outros que conheci nesta instituição que, generosamente, tornaram minha caminhada mais leve e prazerosa.

Às “meninas” da nefrologia, Giovanna Sarri Silva e Ana Maria Ramirez por toda a parceria na execução desse projeto.

Aos meus grandes amigos que me acompanharam nessa jornada Laís Bernardes Molleiro, Gabriela Ribeiro, Bruna Couto, Wilson Oliveira (Xuxu), Flávia Prata Linhares, Patrícia Jabali, Fernanda Martinato, Letícia Orsini pelos



momentos de alegria, conversas, conselhos compartilhados, enfim, por todo o apoio. Vocês são inesquecíveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E por último, mas não menos importante, a todos os animais e seus tutores, que possibilitaram a realização deste estudo, minha gratidão eterna.

## SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3 OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo geral.....	5
3.2 Objetivos específicos .....	5
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1 Animais e grupos experimentais .....	6
4.2 Elegibilidade dos pacientes.....	8
4.3 Obtenção e análise das amostras biológicas.....	9
4.3.1 Hemograma .....	10
4.3.2 Bioquímica sérica.....	10
4.3.3 Urinálise e UP/C .....	11
4.3.4 Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) .....	11
4.3.5 Contagem de reticulócitos .....	12
4.3.5.1 Contagem de reticulócitos manual.....	12
4.3.5.2 Reticulocitometria.....	12
4.4 Análise estatística .....	14
5 RESULTADOS .....	15
6 DISCUSSÃO .....	21
7 CONCLUSÃO.....	24
8 REFERÊNCIAS.....	24



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Fragilidade osmótica eritrocitária de cães acometidos por doença renal crônica**”, protocolo nº 012536/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de setembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 28/02/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	40
Peso / Idade	Diferentes pesos e idades
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Animais atendidos na rotina dos Serviços de Clínica Médica de Pequenos Animais e da Nefrologia e Urologia da FCAV-Unesp – Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de setembro de 2018.

*Fabiana Pilarski*  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

## FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E RETICULOCITOMETRIA EM CÃES ACOMETIDOS POR DOENÇA RENAL CRÔNICA

**RESUMO-** A anemia é considerada um dos fatores para avaliar progressão da doença renal e diminuição da qualidade de vida do paciente. Conforme a doença renal progride, ocorre aumento gradativo na produção de toxinas urêmicas que reduz a meia vida dos eritrócitos circulantes por interferir na estabilidade da membrana eritrocitária. Para tanto, utiliza-se contagem de reticulócitos para classificar a anemia como regenerativa ou não regenerativa. Objetivou-se neste estudo avaliar a resistência da membrana das hemácias, utilizando-se do teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) em cães com doença renal crônica (DRC) e avaliação de reticulócitos. Foram avaliados 43 cães provenientes da rotina do Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - *campus* Jaboticabal. As referidas unidades experimentais foram distribuídas em três grupos, quais sejam, G0 (n=13), composto por cães hígidos e G1, DRC estádios 1 e 2 (n=14) e G2, DRC estádios 3 e 4 (n=16), classificados de acordo com o recomendado pela International Renal Interest Society. A fim de definir os critérios de inclusão dos cães foram feitos, além do exame físico, a avaliação de pressão arterial, hemograma, contagem de reticulócitos, exames bioquímicos, urinálise e relação proteína/creatinina urinária (UP/C). Para execução do teste de FOE as hemácias foram diluídas em concentrações decrescentes de cloreto de sódio e analisadas por citometria de fluxo. As concentrações de creatinina sérica (sCr), ureia sérica (sUreia), fosfato sérico (sP) e UP/C foram superiores no grupo G2 quando comparado ao G0 ( $p < 0,05$ ). Com relação às variáveis hematológicas, foram observadas diferença estatística entre o número de hemácias ( $p < 0,009$ ), hematócrito ( $p < 0,007$ ) e hemoglobina ( $p < 0,007$ ), que decresceu conforme a doença renal avançava. A FOE e os reticulócitos apesar de terem variado individualmente, dependendo do estágio da DRC de cada paciente, não apresentaram diferença estatística quando comparado aos animais controle e doentes, e tampouco quando foram confrontados os diferentes estádios de cães com DRC ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos neste estudo demonstram, portanto que, embora a reticulocitometria seja fiadora da contagem de reticulócitos, a contabilização manual de reticulócitos ainda é uma opção segura e somente com a FOE não é possível prever alterações na membrana do eritrócito em cães com DRC.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo, Hemácias, Hemólise, Nefropatia crônica.

## ERYTHROCYTE OSMOTIC FRAGILITY AND RETICULOCYTOMETRY IN DOGS AFFECTED BY CHRONIC KIDNEY DISEASE

**ABSTRACT-** Anemia is considered one of the factors to assess the kidney disease progress and the decrease in patient's quality of life. As kidney disease progresses, there is a gradual increase in urinary toxin production that shortens the circulating erythrocyte half-life by interfering with erythrocyte membrane stability. To do this, use a reticulocyte count to classify anemia as regenerative or non-regenerative. The objectives of this study were to evaluate the resistance of the red blood cells, using the Erythrocyte Osmotic Fragility test in dogs with chronic kidney disease (CKD) and to evaluate reticulocytes. Forty-three dogs were charged, followed by the routine of the Nephrology and Urology Service of the Governor Laudo Natel Veterinary Hospital of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences - UNESP - Campus Jaboticabal. The experimental units were divided into three groups, namely, G0 (n = 13), consisting of healthy dogs and G1, CKD stages 1 and 2 (n = 14) and G2, CKD stages 3 and 4 (n = 16), classification proposed by the International Renal Interest Society. In order to define the inclusion criteria of dogs made, in addition to physical examination, an assessment of blood pressure, blood count, reticulocyte count, biochemical tests, urinalysis, and urinary protein/creatinine ratio. To perform the erythrocyte osmotic fragility test, red blood cells were diluted in decreasing sodium chloride filters (0.9 to 0.0%) and analyzed by flow cytometry. As creatinine serum concentration (sCr), serum urea (sUL), serum phosphorus (sP) and urinary protein/creatinine ratio. were higher in group G2 when compared to G0 ( $p < 0.05$ ). Regarding hematological variables, statistical differences were observed between the number of red blood cells ( $p < 0.009$ ), hematocrit ( $p < 0.007$ ) and hemoglobin ( $p < 0.007$ ), which decreased according to the advanced kidney disease. A cross-referenced FOE despite varying the number of participants, depending on each patient's CKD stage, shows no statistical difference when it shows control animals and damage, and shows when it is confronted with different cases of dogs with CKD ( $p > 0, 05$ ) The results obtained in this study demonstrate, therefore, that although reticulocytometry is a guarantor of reticulocyte counting, manual reticulocyte counting is still a safe option and only with FOE it is not possible to predict changes in the erythrocyte membrane in dogs with CKD.

**Keywords:** flow cytometry, red blood cell, hemolysis, chronic nephropathy.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos grupos controle e doentes renais crônicos de acordo com a classificação estabelecida pela <i>IRIS staging of canine kidney disease (CKD)</i> – 2019. ....	8
<b>Tabela 2.</b> Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a <i>IRIS staging of canine kidney disease (CKD)</i> – 2019 para a razão proteína - creatinina urinária(UP/C). ....	8
<b>Tabela 3.</b> Subestadiamento da DRC de acordo com a pressão arterial sistólica (PAS) (IRIS, 2019). ....	9
<b>Tabela 4.</b> Variáveis bioquímico-sélicas e métodos analíticos utilizados para suas determinações laboratoriais. ....	9
<b>Tabela 5.</b> Características de acordo com raça, gênero e grupos dos 43 cães avaliados, distribuídos em quatro grupos – controle e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD</i> - 2019). ....	15
<b>Tabela 6.</b> Concentrações sélicas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia) de 43 cães, distribuídos nos grupos: controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2).de acordo com o teste de kruskal-Wallis ( $p<0,05$ ). ....	16
<b>Tabela 7.</b> Concentrações sélicas de fosfato (sP) e da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) de 43 cães distribuídos nos grupos controle e doentes renais crônicos (DRC), estes reagrupados em dois grupos (DRC 1-2, G1; DRC 3-4, G2 – <i>IRISstaging of CKD</i> - 2019). ....	17
<b>Tabela 8.</b> Médias e desvios-padrões obtidos para variáveis hematológicas de 43 cães, distribuídos nos grupos controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2). ....	19

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Citograma ilustrando a quantidade de hemácias íntegras (pontos laranjas) e debris celulares (pontos azuis) em cada gradiente de concentração. Os glóbulos vermelhos (*RBCs*) estão representados no quadrante superior direito no gráfico de dispersão lateral (*side scatter - SSC*) versus detecção de dispersão frontal (*foward scatter - FSC*)..... 12
- Figura 2.** Quantificação de reticulócitos pela avaliação citométrica. Tubo com marcação negativa (2A) e tubo com marcação positiva (2B). *Dotplot* representativo do Gate para seleção de eventos únicos (2A1, 2B1). *Dotplot* representativo da população eritrocitária (2A2, 2B2). ..... 14
- Figura 3.** Representação gráfica dos resultados das análises estatísticas com distribuição dos dados em quartis (mediana, máximo e mínimo) das variáveis hematológicas de cães saudáveis (G0) e daqueles acometidos por doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e DRC 3-4 (G2). ..... 20
- Figura 1.** Representação gráfica dos resultados da análise estatística de Correlação de Spearman R. Comparação de reticulócitos entre os três grupos (cães controle- GC, DRC 1-2 – G1 e DRC 3-4 – G2)..... 19
- Figura 5.** Representação gráfica das curvas obtidas a partir das médias de percentual de hemólise em cada uma das diluições às quais os concentrados de hemácias dos cães controle, DRC1-2 e DRC 3-4 foram submetidos. .... 20



## 1 INTRODUÇÃO

Os eritrócitos podem sofrer alterações morfológicas diante de diversos estados patológicos, tais como doenças renais ou hepáticas (Elias et al, 2004), deficiências nutricionais e diabetes mellitus (Turchetti et al 1997; Della Porta et al 2006). Qualquer situação que provoque alteração de volume, tamanho ou tempo de vida, quantidade de hemoglobina, elasticidade da membrana eritrocitária ou viscosidade sanguínea, influencia diretamente a integridade de membrana (Makinde e Bodade, 1994; Jain, 2010). As hemácias são suscetíveis também às alterações de pH sanguíneo devido a modificações do equilíbrio ácido-base, como pode ocorrer em casos de doenças renais (Polzin et al, 2004). Tais condições podem causar diminuição da resistência celular e, conseqüentemente, ao aumento da fragilidade osmótica eritrocitária (Sant'ana et al 2001).

O volume celular da hemácia mantém-se em equilíbrio graças à estabilidade da membrana, que é composta por proteínas, lipídeos e carboidratos (Makinde e Bodade, 1994). Quarenta por cento da membrana do eritrócito é composta por lipídeos, sendo que o colesterol perfaz dezesseis por cento e os fosfolipídios, vinte por cento de sua composição (Bratosin et al, 1998). Como os lipídeos transitam facilmente entre as lipoproteínas plasmáticas e aquelas da membrana eritrocitária, a composição lipídica da membrana eritrocitária pode se alterar em resposta a mudanças das concentrações séricas de colesterol, afetando, assim, a sobrevivência dos eritrócitos na circulação (Meurs et al, 2005). A estabilidade da membrana pode ser afetada também por fatores como sais, etanol, ureia, oxidação celular e idade (Telen e Kaufman, 1999).

Na análise imediata de esfregaço sanguíneo corado, é possível observar alterações de forma dos eritrócitos, morfológicamente conhecidas como esquizócitos, que resultam do cisalhamento eritrocitário devido a traumas intravasculares. Os acantócitos, que estão associados à deficiência na síntese de colesterol e fosfolipídeos da membrana eritrocitária; os esferócitos, que são encontradas no sangue de cães com anemia hemolítica e os leptócitos, que são eritrócitos que sofreram alterações na razão superfície/volume (Trhall et al, 2015). Tais alterações podem estar associadas com a fragilidade osmótica

eritrocitária (FOE) e, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento de anemias (Makinde e Bodade, 1994; Jain, 2010).

A FOE pode ser testada *in vitro* como escopo de avaliar a resistência osmótica dos eritrócitos, quando submetidos a concentrações decrescentes (0,9 a 0,0%) de solução tamponada de cloreto de sódio (Selimet al, 2009; Jain, 2010).

Além disso, os cães com doença renal crônica (DRC) geralmente apresentam baixa contagem de reticulócitos. A concentração de reticulócitos é muito útil na avaliação de anemias. A taxa de liberação de reticulócitos da medula óssea é o melhor meio de avaliar a função dos componentes eritrocitários da medula óssea (Trhall et al, 2015).

O teste de FOE não deve ser interpretado isoladamente, mas sim em conjunto com os dados hematológicos e avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo (Trhallet al, 2015).

Embora o doente renal crônico apresente anemia normocítica normocrômica, mais frequentemente nos estádios 3 e 4 (Polzinet al, 2009), existem poucos estudos sobre a dinâmica dos eritrócitos na circulação durante o curso da doença, o que enseja a necessidade da condução de experimentos visando melhor compreensão desses eventos. Outro fato importante que justifica esta pesquisa são as dificuldades já conhecidas de se diagnosticar a doença renal crônica em pacientes que ainda não apresentam alterações nas hemácias evidenciadas no quadro eritrocitário (Macdougall, 2001) nos estádios 1 e 2 (IRIS, 2019).

São escassos os relatos envolvendo fragilidade osmótica eritrocitária aplicada às alterações hematológicas em cães com DRC, bem como, a descrição diagnóstica e evolução patológica da população eritrocitária avaliada pela citometria de fluxo.

Com base nas informações precedentes, tendo em vista a alta casuística de DRC em cães e, ademais, sabendo das alterações que esta doença pode provocar no quadro hematológico, este estudo teve como escopo avaliar a resistência da membrana eritrocitária a partir de diferentes concentrações de NaCl, em cães com doença renal crônica correlacionando às alterações clínicas e laboratoriais de tais pacientes.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, embora a reticulocitometria seja fiadora da contagem de reticulócitos, a contabilização manual de reticulócitos ainda é uma opção segura, de execução fácil, rápida, de baixo custo. Mesmo sendo frequente a incidência de anemia em pacientes com doença renal crônica, principalmente nos estádios mais avançados da referida enfermidade, a realização da FOE por citometria de fluxo contribui para a avaliação dos eritrócitos. Porém, somente com essa mensuração, não é possível predizer o status de resistência da membrana eritrocitária em cães com DRC, sendo necessário mais estudos com outros marcadores para um melhor entendimento da dinâmica membranária das hemácias.

## **8 REFERÊNCIAS**

Abbot DL, Mcgrath, JP (1991) Evaluation of a flow cytometric counting procedure for canine reticulocytes by use of thiazole orange. **American Journal of Veterinary Research** 52:723-727.

Borin S (2011) **Estudo da hipoplasia sanguínea e quantificação imunofenotípica de células CD45+ no sangue e na medula óssea de cães com doença renal crônica.** 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –Unesp, Jaboticabal.

Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J (1998) **Biochimie** 80:173-195.

Brow M, Wittwer C (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry** 46:1221-1229.

Buranakarl C, Trisiriroj M, Pondeenana T, Tungitpeanpong P, Jarutakanon R, Penchome R (2008) Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. **Research in Veterinary Science** 10:1010-1103.

Buttarelo M, Bulian P, Prá MD, Barbera P, Rizzoti P (1996) Reticulocyte quantification by Coulter MAXM VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. **Clinical Chemistry** 42:1930-1937.

Chin-Yee I, Keeney M, Lohmann RC (2008) Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. **Clinical laboratory Haematology** 13:177-188.

Cachofeiro V, Goicochea M, Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Lunõ J (2008) Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney International** 111:54-59.

Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, Gallí A, Boggi S, Pietra D, Vanelli L, Marseglia C, Levi S, Arosio P, Lazzarino M, Cazzola M (2006) Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 20:549-555.

Elias F, Lucas SRR, Hagiwara MK, Kogika MM, Mirandola RMS (2004) Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural** 34:413-418.

EvansGO, FaggR (1994) Reticulocytes counts in canine and rat blood made by flow cytometry. **Journal of Comparative Pathology**111:107-111.

Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA (1990) Evaluation of reticulocyte by flow cytometry in a routine laboratory. **American Journal of Hematology**33:13-17.

Finco DR(1995). Evaluation of renal functions. In: Osborne CA, FINCO DR. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Williams and Wilkins.29-49p.

Galvão ALB (2009). Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. **Archives of Veterinary Science**14:178-186.

Galvão ALB (2010)**Avaliação clínico-laboratorial de cães com doença renal crônica sob tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína**,93f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Galvão ALB (2014)**Estresse oxidativo em cães com doença renal crônica**, 95f.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Hall JE (2011)**Tratado de Fisiologia Médica** Rio de Janeiro: Elsevier p. 422-433.

Hsu C, McCulloch CE, Curhan GC (2002) Epidemiology of Anemia Associated with Chronic Renal Insufficiency among Adults in the United States: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, **Journal of the American Society of Nephrology** 13:504-510.

International Renal Interest Society (IRIS) – staging system for chronic kidney disease (CKD), 2019. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>>. Acessado em 12 de agosto de 2019.

JAIN NC (1973) Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian** 63:411-423.

Jain NC (2010)**Hereditary Erythrocyte Enzyme Abnormalities**Editorial Office, Philadelphia:Lea & Febiger,179-185p.

Joske RA, McAlister JM, Pranker TAJ (1956) Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. **Clinical Science**15:511-522.

King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA (1992) Anemia of chronic Renal Failure in dogs, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 6:264-270.

Lankhorst CE, Wish JB (2010) Anemia in renal disease: Diagnosis and management. **Blood Reviews** 24:39–47.

Laharrague P, Corberand JX, Fillola G, Marcelino N (1990) Evaluation of an automatic analyzer of reticulocytes: The Sysmex R-1000. **Annales de Biologie Clinique** 48:253-258.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccatli C (2003) Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation** 18:1272-1280.

Macdougall IC (2001) Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney International** 59:62-72.

Makinde MO, Bobade PA (1994) Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science** 57:343-348.

McCOY JP (2002) Basic principles of flow cytometry. **Hematology Oncology Clinical North American** 6:229-243.

Meurs I, Hoekstra M, Wanrooij E, Hildebrandt RB, Kuiper J, Kuipers F, Hardeman MR, Van Berkel TJ, Van Eck M (2005) HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. **Experimental Hematology** 33:1309–1319.

Nobes PR, Carter AB (1990). Reticulocyte counting using flow cytometry. **Journal Clinical Pathology** 43:675-678.

Oyamatsu T, Shimizu N, Takeuchi K, Yamamoto M (1990) Automated measurement of reticulocyte count by flow cytometry. Analysis of the blood containing abnormal erythrocytes or giant platelets. **Rinsho Byori** 37:807-812.

Ots M, Pechter U, Tamm A (2000) Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**. International Journal of Clinical Chemistry 297:29-41.

Peng L, Yang H, Jiang H, Su J, Peng Z (2001) Automated reticulocyte counting using the Sysmex RAM-1. **Clinical & Laboratory Haematology** 23:97-102.

Pereira PM, Seki MC, Palma PVB (2008) Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:66-70.

Pessoa LF, Bär MM, Dalmas FE, Schneider M, Sacchi JO, Silva MM (2017) **Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos de cães após transfusão sanguínea**. XIII Semana Acadêmica de Medicina Veterinária e IX Jornada Acadêmica de Medicina Veterinária– CCA/UEM/Umuarama-PR.

Phillips JK, Boyd R, Krockenberger MB, Burgio G (2015) Progression of anemia and its relationship with renal function, blood pressure, and erythropoietin in rats with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology** 44:342–354.

Polzin DJ, Osborne CA, Bartges JW, James KM, ChurchillJA (2004) Insuficiência Renal Crônica. IN: Ettinger SJ, Feldman EC. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1721-1749.

Polzin DJ. et al **Calcitriol** In: Bonagura JD, Twedt DC (2009) Kirk's current veterinary therapy XIV. St. Louis: Saunders Elsevier, p.892-895.

Polzin, DJ (2011) Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice** 41:15-30.

Pressler, BM (2015) Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats **Clinics in Laboratory Medicine**35:487-502.

RileyRS, Ben-ezra JM,GoelR (2001).Reticulocytes and reticulocyte enumeration, **Journal Clinical Laboratory Analysis** 15:267-294.

Riley RS, Ben-ezra JM, Tidwell A (2002) Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. **Hematology Oncology Clinical North American**, 16:373-420.

Sant'ana VAC, Birgel EH, Mourão GB, Mirandola MRS (2001) Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural**31:609–614.

Schimenti, KJ,Lacerna K, Wamble, A (1992) Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. **Cytometry**,13:853-862.

Schmid H, Schiff H (2010) Erythropoiesis stimulating agents and anemia of end-stage renal disease. **Cardiovascular Hematology Agents**, San Francisco 8:164-172.

Selim N, Desouky OS, Seham MA, Ibrahim H, AshryHA, Nabila S (2009) Effect of gamma radiation on some biophysical properties of red blood cell membrane, **Romanian Journal Biophys**19:171–185.

Senior DF (2001) Doenças do sistema urinário, In: Dunn JK. **Tratado de medicina de pequenos animais**, São Paulo: Editora Rocca, 622-914p.

Stockham SL, Scott MA (2011)**Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 40-45p.

Suliman ME, Bárány P, Divino Filho JC, Qureshi AR, Stenvinkel P, Heimbürger O, Anderstam B, Lindholm B, BergströmJ (2002). Influence of nutritional status on plasma and erythrocyte sulphur amino acids, sulph-hydryls, and inorganic sulphate in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**17:1050-1056.

Telen MJ, Kaufman RE (1999) The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. et al**Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore: Williams & Wilkins. Cap.10, 193-227p.

Thrall MA (2015) Morfologia eritrocitária. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, CAMPBELL TW. In: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** Editora Rocca LTDA, 52-61p.

Tvedten H, Weiss DJ (2012) Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's: Veterinary Hematology**.Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 143-145p.

Turchetti V, De Matteis C, Leoncini F, Trabalzini L, Guerrini M, Forconi S (1997) Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. **Clinical Hemorheology and Microcirculation** 17:209-215.

Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, Takeda M, Ueki S, Itoga M, Kojima K, Kayaba H (2014) Flow Cytometric Analysis of Red Blood Cell Osmotic Fragility, **Journal Laboratory Automation**19:483-487.



Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M (2011) Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory, **Blood Purification** 23:97-102.